美洲大蠊内生菌几丁质酶基因的克隆、表达及其活性研究

许敏华[1] 张晶晶[1] 金小宝[1] 李小波[1] 王艳[1] 马艳[1*]

(1.广东药科大学 广东省生物活性药物研究重点实验室，广东广州 510006)

摘要【目的】对美洲大蠊内生粘质沙雷氏菌几丁质酶 ChiA 基因进行克隆、可溶性表达及功能验证。**【方法】**PCR 扩增 ChiA 基因，TA 亚克隆，构建重组表达载体 ChiA/pET21b，生物信息学分析和低温诱导表达、SDS-PAGE、Western-Blot 鉴定，打孔法对几丁质酶活性检测。**【结果】**PCR 成功扩增了 ChiA 基因序列，该序列与 Gen Bank 上的 *S. marcescens* ChiA 基因序列同源性达 99%；该序列编码 571 个氨基酸，并能够在原核系统中稳定表达。可溶性表达分析显示：通过低温诱导表达，获得可溶性的目的蛋白；活性试验发现：含目的蛋白的表达产物可分解几丁质，且活性强于美洲大蠊内生粘质沙雷氏菌。**【结论】**从美洲大蠊内生粘质沙雷氏菌基因组中成功克隆了几丁质酶 ChiA 基因，通过原核表达系统获得了具有较强活性的可溶性几丁质酶 ChiA，为其应用奠定了基础。

关键词：美洲大蠊；粘质沙雷氏菌；几丁质酶 ChiA；可溶性表达；活性验证

Cloning\Expression and Bioactivity of the Chitinase Gene ChiA from the Endophytes of *Periplaneta Americana*

XU Min-hua[1] ZHANG Jing-jing[1] JIN Xiao-bao[1] WANG Yan[1] MA Yan[1*]

(1. Guangdong Pharmaceutical University, Guangdong Key Laboratory of Pharmaceutical Bioactive Substances, Guangzhou, 510006, China)

Abstract: [Objective] To clone the Chitinase Gene ChiA from the endophytes of *Periplaneta Americana* soluble expression of the protein and to identify its function. [Methods] The Chitinase Gene ChiA was amplified by PCR from the DNA of *Serratia marcescens,*which was separated from the gut of *Periplaneta American* and obtained by subcloning. The expression plasmid ChiA/pET21b was constructed and analyzed by bioinformatics. The plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and the postive strains were induced by IPTG at 20℃ for 20 h. The bioactivity of the protein was determined by Small Punch Test . [Results]The cloned sequence was associated with *S. marcescens* ChiA Gene of Gen Bank and their homology was 99%. The sequence encoded a protein containing of 571 amino acids and expressed stably in prokaryotic system .SDS-PAGE/Western-Blot show that the soluble target protein was obtained. The Small Punch Test suggested that the target protein had the activity of decomposing chitin and was stronger than that of the Serratia marcescens. [Conclusion] The Chitinase Gene ChiA of the *Serratia marcescens* from the gut of *Periplaneta Americana* was cloned successfully. The soluble chitinase that shows marked bioactivity was attained by prokaryotic expression system, which has provided theoretical basis for its further application.

Keywords: *Periplaneta Americana*; *Serratia marcescens*; chitinase ChiA; soluble expression; bioactivity

---

基金项目：国家自然科学基金(81502520),广东省自然科学基金(2016A030310299),广东省医学科研基金(A2016077)

作者简介：许敏华，女，在读硕士，研究方向：生物活性物质开发与应用研究; E-mial:403052575@qq.com

*通讯作者：马艳，女，博士，研究方向: 生物活性物质开发与应用研究; E-mial: mayan820901@126.com

几丁质(chitin)又称甲壳素，是 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖通过β-1,4-糖苷键连接起来的直链多聚物[1]，广泛存在于自然界中，是居第二位的可再生资源，仅次于纤维素[2]。几丁质降解后产生的几丁寡糖、几丁单糖及其衍生物，在生物医药、工农业、食品等领域有着广泛的应用前景[3]。但工业上提取几丁质衍生物，大多先使用强酸或强碱除去蛋白杂质和色素等进行预处理，再采用化学法、物理法或酶解法对壳聚糖进一步处理才能得到几丁质衍生物。其中化学法对环境容易造成污染，且容易发生副反应；物理法则对工业设备的要求高，得到的产物容易不均；酶解法相对化学法和物理法，其优点为对设备要求不高，反应产物可控，不危害环境等，是一种更为合理高效的方法[4]。几丁质酶(chitinase, EC 3.2.1.14)是 Benecke.U 在 1905 年研究几丁质芽孢杆菌(Bacillus chitinovrous)分解几丁质的过程中，首次分离发现[5]。几丁质酶以几丁质为底物，可催化水解几丁质的β-1,4 糖苷键生成 N-乙酰-氨基葡萄糖[6]。目前已从土壤、贝类废弃物、花园和温泉等地方分离得到几丁质酶产生菌[7]。其中，粘质沙雷氏菌(Serratia marcescens)是一种相对高产几丁质酶的菌种，能分泌许多抗生性代谢产物(如脂肽、碳青霉烯、灵菌红素、几丁质酶、异硫霉素等)，可有效抑制不同植物病原真菌生长 [8]。

本实验室前期研究工作当中，从美洲大蠊肠道内分离出多株内生菌，其中就包括粘质沙雷氏菌[9]，编号 WA12 1-18（由本实验室保存，GenBank 登录号：*MH341634*）。有研究表明，由于昆虫内生环境与普通的自然环境不同，故昆虫内生菌可能受特殊的环境影响而产生不同的代谢产物，特殊的次级代谢产物具有潜在的医疗价值、新颖的分子结构和复杂的生物合成路径等应用价值[10]，而本次研究从美洲大蠊内生粘质沙雷氏菌基因组中克隆几丁质酶 ChiA 基因，通过原核表达系统获得可溶性几丁质酶，并对其活性进行初步验证，为对该菌株后续的深入研究和应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1. 实验材料与试剂

1.1.1 实验菌株　粘质沙雷氏菌 WA12 1-18，大肠杆菌 *E. coli* DH5α，大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)，pET21b 载体（本实验室保存）。

1.1.2 实验试剂　LA Taq DNA Polymerase, 限制性内切酶 *Xho* I 和 *Nde* I，T_4 DNA Ligase，pMD18-T，DNA 分子量标准(均购自 TaKaRa 公司)；DNA 纯化回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒（购自 TIANGEN 公司）；第一链合成试剂盒（购自 Invitrogen 公司）；蛋白预染 Marker(购自 fermentas 公司)；甲壳素（购自上海麦克林生化科技有限公司）；琼脂糖(购自 Amresco 公司)；His-Tag(IOE2)mAb，山羊抗小鼠 IgG HRP 标记二抗购自 santa cruz 公司；其余常用试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 ChiA 基因的 PCR 扩增和 TA 克隆

根据细菌 DNA 提取试剂盒操作步骤提取美洲大蠊内生粘质沙雷氏菌 WA12 1-18 基因组 DNA。根据 GenBank: *AY855211.1* 的 ChiA 基因序列，用 Primer Premier 5.0 生物软件设计两条特异性引物:

F: 5' CCGGAATTCCATATGCGCAAATTTAATAAACCGCTGTTGG 3'

R: 5' GCTCTAGACTCTCGAGTTGAACGCCGGCGCTGTTGCCCAG 3'

在引物 F5’ 端引入 *Nde* I 限制性内切酶位点，引物 R 5’ 端引入 *Xho*I 限制性内切酶位点，去除终止密码子。以基因组 DNA 为模板，用 TaKaRa LA Taq 扩增 ChiA DNA 序列，PCR 反应条件：95℃变性 30 s，60℃退火 45min，72℃延伸 2min，共 30 个循环。凝脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果。将 PCR 产物与 pMD18-T 载体进行连接，并转化至 *E.coli* DH5α感受态中进行蓝白斑筛选。挑取白色单克隆菌落抽提质粒并进行酶切鉴定，将鉴

定为阳性的重组菌株 ChiA/pMD18-T/DH5α送上海 Invitrogen 公司进行测序。

1.2.2 表达载体 ChiA/pET21b 的构建及鉴定

将测序正确的ChiA/pMD18-T及原核表达载体pET21b分别用限制性内切酶*Xho*I和*Nde*I进行双酶切。回收酶切产物后，将酶切的ChiA基因与酶切的pET21b通过T4连接酶进行连接，转化大肠杆菌DH5α感受态，转化菌种涂于含有Ampcillin平板，培养18 h后，挑取单菌落进行菌落PCR和提质粒酶切鉴定后，将鉴定为阳性的重组菌株ChiA/pET21b/DH5α送上海Invitrogen公司进行测序。

1.2.3 ChiA 基因生物信息学分析

利用 http: //expasy. org 网站提供的分析工具 ProtParam (http://www.expasy.ch/ tools/ protparam.html) 分析 ChiA 基因编码蛋白的氨基酸序列的基本物理化学参数，包括：氨基酸组成、分子量、理论等电点，在哺乳动物、大肠杆菌、酵母中的半衰期，不稳定指数，脂溶性指数等；并利用 http://expasy.org 网站提供的 ProtScale 工具分析基因表达产物各氨基酸的疏水性变化，分析其亲水性/疏水性。

1.2.4 ChiA/pET21b/BL21重组菌株的诱导表达和可溶性分析鉴定

将测序正确的表达载体ChiA/pET21b转化到*E.coil* BL21(DE3)感受态中，获得ChiA/pET21b/ BL21重组菌株。挑取单菌落接种于5 mL含100 μg/mL Ampcillin的LB培养基中，37℃振摇培养过夜，然后将此菌液按1:100比例接种到新鲜的LB液体培养基中，37℃培养2.5 h(OD_{600}约0.6)，加入终浓度为0.1 mmol/L IPTG, 20℃诱导表达20 h。收集菌体，将菌体用1×PBS洗涤2次后悬浮于裂解缓冲液(10 mmol/L Tris.Cl，1 mmol/L EDTA，pH8.0)中，冰上超声裂解，超声条件：30%功率，超声10 s，间隔15 s，15 min。8000 r/min离心15 min，取菌体、上清和沉淀进行SDS-PAGE分析和Western-Blot鉴定。

1.2.5 打孔法检测目的蛋白分解几丁质的活性

根据文献已有的方法[11]，制备胶状几丁质：取粉状几丁质 10 g 加入到 100 ml 的浓盐酸中, 冰浴，搅拌 30 min 后于 4℃的冰箱内静置 24 h。取出后边搅拌边加入到装有 3 L 水的烧杯中, 静置分层后吸去上清液, 再加入蒸馏水, 搅拌并静置。如此反复操作 7-8 次, 用单层纱布过滤大颗粒, 直至溶液 pH 值达到 6.4 即可。将制备得到的 10ml 胶体几丁质倒入已融的 100 ml 固体 LB 培养基中，倒平板备用。每个平板打 4 个孔，标记为 1-4。在孔中分别加入 100 μl 的 ChiA/pET21b/BL21 重组菌株菌体、WA12 1-18 菌体、ChiA/pET21b/BL21 裂解菌体的上清液、裂解缓冲液。

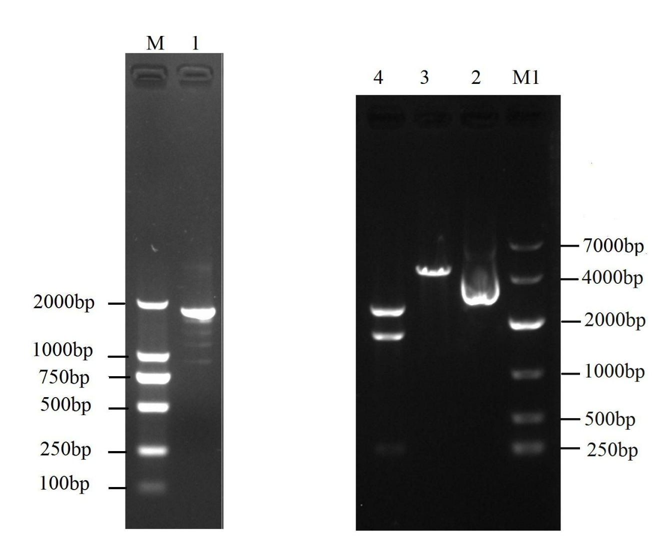
2 结果与分析

2.1 ChiA 基因的克隆及鉴定

GenBank: *AY855211.1* 的 ChiA 基因序列为 1692 bp。PCR 扩增结果和 ChiA/pMD18-T 酶切鉴定结果均显示：在约 1700 bp 处有一目的条带（图 1）。将阳性的重组菌株 ChiA/pMD18-T/DH5α送去测序，结果显示目的序列与 GenBank 中登录号 *CP003959.1* 的 Serratia marcescens WW4 ChiA 仅有 4 个碱基突变，分别位于为 372、1479、1506、1552bp 处，由于氨基酸密码子的兼并性，仅有一个有义突变 Thr-Ala, 且两个氨基酸都属于不带电荷的中性氨基酸，对蛋白质结构影响不大。

2.2 ChiA/pET21b 表达载体的构建与鉴定

对构建重组表达载体 ChiA/pET21b 进行菌落 PCR 和酶切鉴定，结果如图所示（图 2）：菌落 PCR 在约 1700 bp 处有一目的条带；双酶切有两条目的条带，大小分别约 1700bp 和 5443 bp。测序结果：目的基因和表达载体连接方向正确，经 ORF Finder 软件分析得到 1716 bp 开放阅读框。



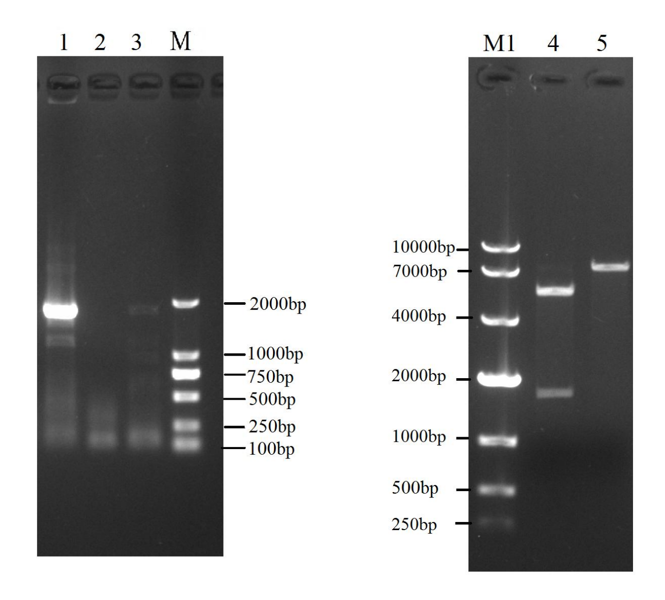
M: DL2000 DNA marker　1: PCR 扩增产物　M1: DL10000 DNA marker　2: ChiA/pMD18-T 质粒

3: ChiA/pMD18-T *Xho* I 单酶切　4: ChiA/pMD18-T *Nde* I/*Xho* I 双酶切

图 1　ChiA 基因的 PCR 扩增及 TA 克隆鉴定

Fig.1 PCR amplification and sucloning of ChiA gene

M:DL2000 DNA Marker　1: PCR product of ChiA gene　M1: DL10000 DNA Marker　2: PCR product of ChiA/pMD18-T　3: ChiA/pMD18-T digested with *Xho I*　4: ChiA/pMD18-T digested with *Nde I/Xho I*



M:DL2000 DNA marker　1: 阳性菌落PCR扩增产物　2、3: 阴性菌落PCR扩增产物　M1: DL10000 DNA marker

4: ChiA/pET21b *Xho* I单酶切　5: ChiA/pET21b *Nde* I/*Xho* I双酶切

图2　ChiA/pET21b表达载体的鉴定

Fig.2　screening of recombinant plasmidsChiA/pET21b

M: DL2000 DNA Marker　1: PCR product of ChiA gene from positive colonies　2/3: PCR product of negative colonies　M1: DL10000 DNA marker　4: ChiA/pET21b digested with *Xho I*　5: ChiA/pET21b digested with *Nde I/Xho I*

2.3 生物信息学分析结果

上述开放阅读框基因编码的蛋白包含 571 个氨基酸（图 3），分子量为 62 kD，其中，带负电的氨基酸残基(Asp+Glu)57、带正电的氨基酸残基(Arg+Lys)54，理论等电点为 6.47。在哺乳动物体外、酵母体内、大肠杆菌体内半衰期分别为 30 h、＞20 h、＞10 h，不稳定指数为 14.56。

用 ProtScale Server (http://www.expasy.org/tools/protscale.html) 进行亲水性/疏水性预测结果显示，多肽链第 151 位的 Pro 亲水性最强(-3.178)，第 12 位的 Leu 和第 13 位的 Ile 疏水性最强(2.178)，其亲水氨基酸数量大于疏水氨基酸(图 4)。

```
        10         20         30         40         50         60
MRKFNKPLLA LLIGSTLCSA AQAAAPGKPT IAWGNTKFAI VEVDQAATAY NSLVKVKNAA

        70         80         90        100        110        120
DVSVSWNLWN GDTGTTAKVL LNGKEAWSGP STGSSGTANF KVNKGGRYQM QVALCNADGC

       130        140        150        160        170        180
SASDATEIVV ADTDGSHLAP LKEPLLEKNK PYKQNSGKVV GSYFVEWGVY GRNFTVDKIP

       190        200        210        220        230        240
AQNLTHLLYG FIPICGGNGI NDSLKEIEGS FQALQRSCQG REDFKVSIHD PFAALQKAQK

       250        260        270        280        290        300
GVTAWDDPYK GNFGQLMALK QAHPDLKILP SIGGWTLSDP FFFMGDKVKR DRFVGSVKEF

       310        320        330        340        350        360
LQTWKFFDGV DIDWEFPGGK GANPNLGSPQ DGETYVLLMK ELRAMLDQLS AETGRKYELT

       370        380        390        400        410        420
SAISAGKDKI DKVAYNVAQN SMDHIFLMSY DFYGAFDLKN LGHQTALNAP AWKPDTAYTT

       430        440        450        460        470        480
VNGVNALLAQ GVKPGKIVVG TAMYGRGWTG VNGYQNNIPF TGTATGPVKG TWENGIVDYR

       490        500        510        520        530        540
QIAGQFMSGE WQYTYDATAE APYVFKPSTG DLITFDDARS VQAKGKYVLD KQLGGLFSWE

       550        560        570
IDADNGDILN SMNASLGNSA GVQLEHHHHH H
```

Number of amino acids: 571

图3 氨基酸序列

Fig.3 Amino acid sequence

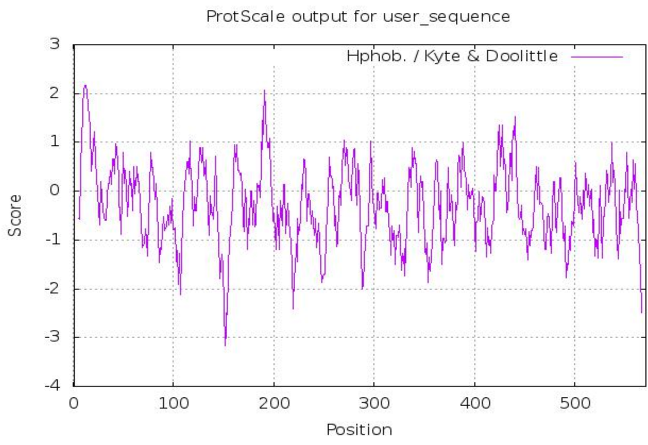
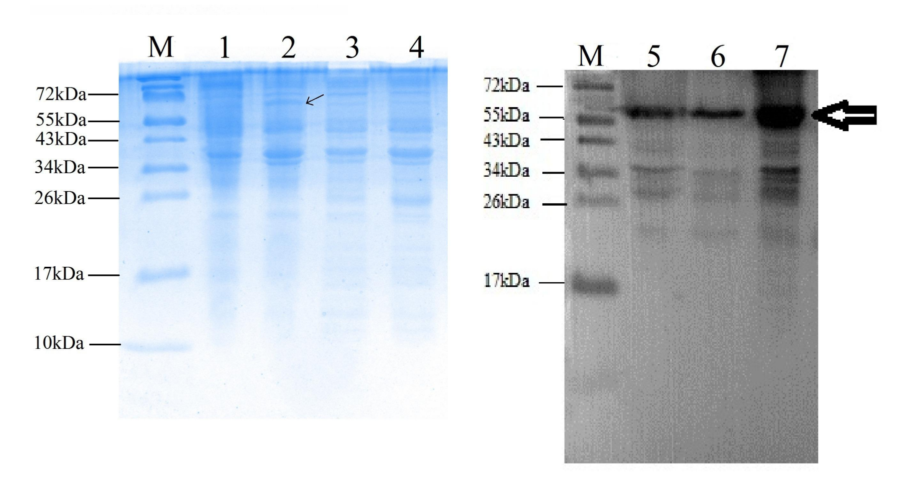


图 4 亲水性/疏水性预测结果

Fig.4　Hydrophilicity or Hydrophobicity prediction result

2.4 表达产物的鉴定及可溶性分析

将构建成功的表达载体ChiA/pET21b转化BL21中进行诱导表达，SDS-PAGE分析表明：在62 kD处有目的条带。用鼠源His单克隆抗体为一抗进行Western-Blot，结果显示诱导后总菌体以及菌体的裂解上清在62 kD处均有一条特异性条带（图5）。



M: 蛋白质分子量标准　1: 诱导前ChiA/pET21b/BL21　2: 诱导后ChiA/pET21b/BL21　3: 诱导前pET21b/BL21　4:　诱导后pET21b/BL21　5:　诱导后ChiA/pET21b/BL21　6:　上清液　7:　沉淀物

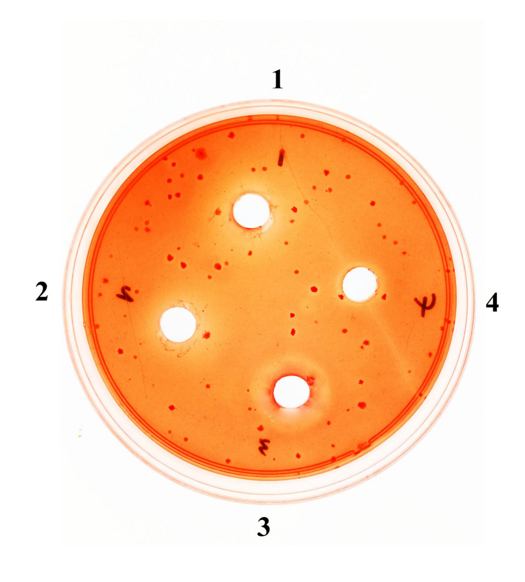
图5　SDS-PAGE和Western-Blot结果

Fig.5　The result of the SDS-PAGE and Western-Blot

(M: Protein molecular weight marker　1: Total proteins of ChiA/pET21b/BL21 by uninduced　2: Total proteins of ChiA/pET21b/BL21 by induced　3: Total proteins of pET21b/BL21 by uninduced　4: Total proteins of pET21b/BL21　5: Total proteins of ChiA/pET21b/BL21 by induced　6: Total proteins of liquid supernatant　7：Total proteins of sediment)

2.5 几丁质酶活性实验结果

在含有几丁质的 LB 固体培养基中分别加入粘质沙雷氏菌 WA12 1-18、诱导表达后的 ChiA/pET21b/BL21 菌以及菌体超声破碎后的裂解上清液。实验当中所使用的缓冲液作为空白对照组。加有种菌和上清液的孔周围出现透明圈，空白对照组没有透明圈，其中，裂解上清液产生的透明圈直径大于 ChiA/pET21b/BL21 菌和粘质沙雷氏菌 WA12 1-18 产生的透明圈直径（图 6 表 1）。



1: ChiA/pET21b/BL21　2: WA12-1-18　3: ChiA/pET21b/BL21 上清液　4: 缓冲液

图 6　活性测试

Fig.6　bioactivity test

1: ChiA/pET21b/BL21　2: WA12-1-18　3: liquid supernatant of ChiA/pET21b/BL21　4: buffer solution

表 1 几丁质酶活性检测结果汇总表

Table 1　The result of bioactivity test of Chitinase

	有无几丁质酶活性表达	透明圈大小(mm)
ChiA/pET21b/BL21 上清液	+	24±2.7
WA12 1-18	+	22±2.1
ChiA/pET21b/BL21	+	20±1.6
缓冲液	-	---

3 讨论

本实验首次成功克隆美洲大蠊肠道内生粘质沙雷氏菌的几丁质酶 ChiA 基因序列。通过 NCBI Blast 序列对比，该基因序列与登录号为 *CP003959.1*、*Z36294.1*、*Z36294.1*、*CP021984.1*、*KP728831.1* 的 Serratia marcescens ChiA 基因相似度均高达 99%以上。其中与 *CP003959.1* 的 Serratia marcescens WW4 ChiA ，仅有 4 个碱基不同，分别为：372bp: C-T、1479bp:T-C、1506bp:T-A 、1552bp:A-G（ACC-GCC：Thr-Ala），由于氨基酸密码子的兼并性，仅有一个有义突变 Thr-Ala，且两个氨基酸都属于不带电荷的中性氨基酸，对蛋白质结构影响不大[12]；与 *Z36294.1* 的 S.marcescens (BJL200) chiA gene for chitinase 有 7 个碱基不同，分别为：477bp: G-C、588bp:T-C、703bp: C-T(CTG-TTG：Leu-Leu)、822bp:C-T、1479bp: T-C、1506bp: T-A、1518bp: A-G，且没有氨基酸改变，不造成蛋白质结构的改变；可见，本实验克隆的几丁质酶 ChiA 基因保证了几丁质酶 A 的固定结构和生物活性[13]，后续实验也验证了表达的目的蛋白具有几丁质酶生物活性。

本实验在设计引物 R 时，去除 ChiA 基因末端的终止密码子，构建的重组表达载体 ChiA/pET21b 开放阅读框序列包含 ChiA 基因序列、Xho I 酶切位点和 pET21b 载体上编码 6*HIS 的基因序列共 1716 bp，编码 571 个氨基酸。生物信息学分析：编码蛋白在大肠杆菌体内半衰期＞10 h，不稳定指数为 14.56，利于原核系统表达；两亲性指数 GRAVY 为-0.465，其亲水氨基酸数量大于疏水氨基酸，表明其具有亲水性，有利于可溶性表达及后续的分离制备[14]。另外，SDS-PAGE 实验结果和 Western-Blot 结果证实了 ChiA 在原核表达系统中成功表达。活性测试显示粘质沙雷氏菌 WA12 1-18、诱导表达后的 ChiA/pET21b/BL21 菌菌体和裂解上清液均出现不同大小的透明圈，空白对照组没有透明圈，裂解上清液产生的透明圈直径最大（约 24 mm），表明表达产物几丁质酶为可溶性表达，且裂解上清液产生的透明圈大于 ChiA/pET21b/BL21（约 20 mm）菌体和粘质沙雷氏菌 WA12 1-18（约 22 mm）。与已有文献对比[15]，文献中最大透明圈直径约 28mm，通过对比可见 ChiA/pET21b/BL21 菌诱导表达的可溶性几丁质酶效果较为明显，具有较强的活性。

几丁质酶虽广泛存在于自然界中，但是活性低，产量低，不能达到分解几丁质和几丁低聚糖大量生产的要求[16]。大肠杆菌在生物技术研究和生物药物产业化进程中有着重

要地位，因其繁殖快、成本较低廉、目的基因表达水平较高而常被选为表达产物的工具[17]，我们希望借助其特点来帮助几丁质酶顺利表达，提高产量和量产稳定化。粘质沙雷氏菌是一种高产几丁质酶的常用菌种，在农业生防等领域具有巨大的应用潜力，本实验室首次从蜚蠊体内分离出的粘质沙雷氏菌，鲜有关于蜚蠊内生粘质沙雷氏菌几丁质酶活性的报道，且因其特殊的生长环境，考虑其可能具有比自然界更高活性的几丁质酶，本研究寄望把两者结合，提高几丁质酶的产量、活性及表达稳定性。虽然早在 1989 年，Shapira 等以 PBR322 质粒为载体克隆出粘质沙雷氏菌的几丁质酶 ChiA 基因，但该质粒的几丁质酶表达水平不高[18]。故本实验将蜚蠊内生粘质沙雷氏菌的几丁质酶 A 基因克隆、可溶性表达并获得具有良好活性的几丁质酶 ChiA，为几丁质酶 ChiA 的深入研究和应用奠定了基础，为几丁质的利用和推进生产化进程提供新的研究思路。

本研究通过 PCR 从蜚蠊内生粘质沙雷氏菌基因组中成功克隆了几丁质酶 A 基因，并构建了原核表达系统 ChiA/pET21b/BL21，经 IPTG 诱导、SDS-PAGE 和 Western-Blot 分析表明目的蛋白表达成功，用平板打孔法初步证明了诱导表达的蛋白具有几丁质酶活性，其活性强于粘质沙雷氏菌（WA12 1-18），且在上清液中表达的几丁质酶稳定性亦强于粘质沙雷氏菌（WA12 1-18）。这为几丁质酶后续的生物学活性研究及生产产业化开发应用奠定了一定的基础。

参考文献

[1] Yuli P E, Suhartono M T, Rukayadi Y, et al. Characteristics of thermostable chitinase enzymes from the indonesian Bacillus sp.13.26[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35(2/3): 147-153

[2] Dutta J, Tripathi S, Dutta P K, et al. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a system-atic study needs for food applications[J]. Food Science and Technology International, 2012, 18(1): 3-34

[3] Horn S J, Sikorski P, Cederkvist J B, et al. Costs and benefits of processivity in enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides[J]. P Natl Acad Sci USA, 2006, 103(48): 18089-18094

[4] 李海浪．壳聚糖衍生物的制备及其在药物载体中的应用研究． 上海：中国科学院上海应用物理研究所，2014．

Li H L. Study on the preparation of chitosan derivatives and their applications in drug delivery. Shanghai: Institute of Applied Physics, Chinese Academy of Sciences, 2014

[5] Benecke U. Bacillus chitinovorous einen chitin zersetzenden Spaltpilz[J]. Bot Ztg, 1905, 63(8): 227-242

[6] Merzendorfer H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insect: common principles and differaices[J]. Eur J Cell Biol. 2011, 90(9): 759-769

[7] 糜艳霞, 任 慧, 张 常，等. 几丁质酶的研究进展[J]. 生命科学研究, 2015, 19(5): 437-442

Mi Y X, Ren H, Zhang C, et al. Advances in Study and Application on Chitinase[J]. Life Science Research, 2015, 19(5): 437-442

[8] 白腾飞，刘月芹. 沙雷氏菌抗生性次级代谢产物合成机制[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(4): 115-119

Bai T F, Liu Y Q. A Survey of Synthesis Mechanism of Antibiotic Secondary Metabolites by Serratia spp[J]. Journal of microbiology, 2017, 37(4):115-119

[9] 方霞，沈娟，王影姣，等. 药用昆虫美洲大蠊内生放线菌的分离和鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(6): 550-565

Fang X, Shen J, Wang Y J, et al. Isolation and identification of endophytic actinomycetes from medical insects (*Periplaneta Americana)*[J]. Journal of Pathogen Biolagy, 2016, 11(6): 550-565

[10] Van Arnam E B, Currie C R, Clardy J. Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses[J]. Chemical Society Reviews, 2018, 47(57): 1638–1651.

[11] 贺淹才, 刘爱花, 柴思捷, 等. 改进 RBB 染色法初步筛选几丁质酶基因 chiA 的表达[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2008, 29(4): 563-566

He Y C, Liu A H, Chai S J, et al. Improved RBB dyeing method screen bacteria of expression of chintinase chiA[J]. Journal of Huaqiao University (Natural Science), 2008, 29(4): 563-566

[12] Chung W C, Chen L L, Lo W S, et al. Complete Genome Sequence of Serratia marcescens WW4[J]. Genome Announc. 2013,4(2): 12-13.

[13] Francesco M, Sushmita M. Natural computing methods in bioin-formatics: A survey[J]. Information Fusion,2009,10(3) : 211-216.

[14] Balzer S, Kucharova V, Megerle J, et al. A comparative analysis of the properties of regulated promoter systemscommonly used for recombinant gene expression in Escherichiacoli[J]. Microb Cell Fact, 2013, 12: 26-27

[15] 刘丹，孟凡欢，李爽，等. 一株产几丁质酶渤海丝状真菌（Alternaria tenuissima）的筛选及鉴定[J]. 2012, 31(2) : 45-28

Liu D, Meng F H, Li S, et al. Screening and identification of chitinase-producing fungus (Alternaria tenuissima) from Bohai Bay[J]. 2012, 31(2) : 45-28

[16] 李晶, 于丽萍, 刘宇帅, 等. 粘质沙雷氏菌几丁质酶基因的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(9): 3837-3841.

Li J, Yu L P, Liu Y S, et al. Research progress of chitinase gene from *Serratia marcescens*[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(9): 3837-3841

[17] 孟利强, 沙长青, 张先成, 等. 粘质沙雷氏菌几丁质酶基因 ChiA 克隆及生物信息学分析[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(1): 62-68

Meng L Q, Sha C Q, Zhang X C, et al. Cloning and bioinformatics analysis of chitinase gene ChiA from *Serratia marcescens*[J]. Journal of Microbiology, 2016, 36(1): 62-68

[18] Shapira R., Ordentlich A., Chet I, et al. Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in Escherichiacoli[J]. Phytopathology, 1989, 79(11): 1246-1249